

仿生量子点脂质体纳米探针的合成

崔曼曼, 潘炜伦, 刘春辰, 李博

南方医科大学南方医院检验科, 广东 广州 510515

【摘要】目的:合成仿生量子点脂质体纳米探针(PEG-LP-QDs),优化合成条件并初步探究PEG-LP-QDs的性质,为PEG-LP-QDs在体内示踪、肿瘤成像、多重检测等生物医学领域的应用奠定基础。**方法:**采用薄膜分散法,以磷脂酰胆碱、聚乙二醇(PEG)-磷脂酰乙醇胺、胆固醇为膜材,包裹一定量的油溶性ZnCdSe/ZnS量子点(QDs)合成PEG-LP-QDs;通过透射电子显微镜(TEM)、纳米颗粒追踪技术(NTA)、荧光分光光度计鉴定并分析PEG-LP-QDs的形貌、粒径和荧光强度,进而优化合成温度及QDs数量。**结果:**根据合成的LPs粒径与QDs的荧光强度变化,选取40℃为最佳合成温度;TEM和NTA结果证实PEG-LP-QDs合成成功,粒径集中分布于128 nm左右;且当加入10 μL浓度为3 mg/mL的QDs时,PEG-LP-QDs的荧光强度达到最大值。**结论:**成功合成新型PEG-LP-QDs,具有良好的生物相容性和独特的发光特性,其在生物医学领域中的应用价值有待进一步研究。

【关键词】纳米探针;脂质体;量子点;仿生膜

【中图分类号】R319;O657.3

【文献标志码】A

【文章编号】1005-202X(2018)07-0849-06

Synthesis of cell membrane biomimetic liposome-quantum dot nanoprobe

CUI Manman, PAN Weilun, LIU Chunchen, LI Bo

Department of Laboratory, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To synthesize a biomimetic autofluorescence nanoprobe, polyethylene glycol-liposome-quantum dots (PEG-LP-QDs), optimize the synthesis conditions and preliminarily characterize their properties for laying the basis for further application of PEG-LP-QDs in biomedical fields, such as *in vivo* tracking, tumor detection and multiplex detection. **Methods** Oil-soluble fluorescent ZnCdSe/ZnS quantum dots were encapsulated by phosphatidylcholine, PEG-phosphatidyl ethanolamine and cholesterol through thin membrane dispersion method for synthesizing PEG-LP-QDs. Transmission electron microscope, nanoparticle tracking technology and fluorescence spectrophotometer detection methods were used to characterize the morphology, diameter size and fluorescence intensity of PEG-LP-QDs, thus further optimizing the synthesis temperature and QDs quantity. **Results** As the change of synthesis temperature, the results of LP size-changing and QDs fluorescence-decreasing implied that 40℃ was a desired temperature. The results of transmission electron microscope and nanoparticle tracking technology proved that PEG-LP-QDs were successfully synthesized. The average diameter size of PEG-LP-QDs was 128 nm. The fluorescence intensity of PEG-LP-QDs reached the maximum when 10 μL 3 mg/mL QDs were encapsulated. **Conclusion** A novel biomimetic autofluorescence nanoprobe, PEG-LP-QDs, is successfully synthesized, with good biocompatibility and unique luminescent properties. Further work is needed to investigate the application of biomimetic PEG-LP-QDs in biomedical research.

Keywords: nanoprobe; liposomes; quantum dots; biomimetic membrane

前言

【收稿日期】2018-06-22

【基金项目】国家自然科学基金青年项目(81702100)

【作者简介】崔曼曼,主要研究方向:重要疾病标志物快速诊断生物传感技术的应用基础研究,E-mail: 13265022193@qq.com

【通信作者】李博,医学硕士,讲师,主管技师,主要研究方向:重要疾病标志物快速诊断生物传感技术的应用基础研究,E-mail: nfylibo2012@smu.edu.cn

近年来,荧光纳米探针在生物学上的应用越来越广泛^[1],其大小为纳米级、表面易修饰、自发独特荧光,在体内示踪^[2]、病原体检测^[3]、肿瘤成像^[4]、手术治疗^[5]等方面具有潜在的应用价值。然而,体内网状内皮系统(Reticuloendothelial System, RES)的清除作用将大大缩短其在体内的循环时间,且一些纳米材料具有一定的细胞毒性,极大限制其在临床上的应用^[6],因此急需研发出一种生物相容性较好的新型仿生纳米探针。有研究者^[7]利用不同种类的细胞膜包

裹传统纳米探针制备出具有良好生物相容性和靶向性的细胞膜仿生纳米探针,但细胞膜的来源有限且制备复杂,难以实现大规模、高效率的生产。脂质体(Liposomes, LPs),又称脂囊泡(Lipid Vesicle),具有与细胞膜相似的磷脂双分子层结构^[8],能够将亲水或疏水性的物质包裹到其亲水核心或脂质双层中,已广泛应用于药物运送^[9]。聚乙二醇(PEG)修饰磷脂酰乙醇合成的脂质体为长循环脂质体,PEG一方面增加LPs的亲水性,使其在人体内环境中稳定流动,另一方面PEG具有良好的生物亲和性,能有效降低RES的清除作用,延长其在体内的存在时间,保证大部分LPs能够到达靶向部位发挥作用^[10],因此PEG-LPs可成为新型仿生纳米探针的理想载体。目前已有研究者将有机荧光染料与LPs结合制备出荧光脂质体探针,应用于磷脂酶活性检测^[11]、肿瘤成像及靶向治疗^[12]。量子点(Quantum Dots, QDs)是由II—VI族或III—V族元素组成的大小为1~10 nm的荧光纳米颗粒^[13],具有优于传统荧光材料的发光特性:激光光谱宽、连续分布;发射光谱窄、对称分布;抗漂白性强;发光稳定;有望弥补有机荧光染料和荧光蛋白质生物标记、荧光猝灭等方面的不足^[15]。但由于QDs含有重金属元素,具有一定生物毒性,且其多保存于有机溶剂中,难以溶入生物水相环境,大大限制了QDs的生物应用^[16]。为解决这些问题,有研究者将QDs包裹到LPs中制备出量子点脂质体纳米探针用于核酸检测^[17]和肿瘤诊疗^[18-19]。

为了获得生物亲和性好和荧光性强的仿生纳米探针,本研究将PEG-LPs和QDs结合起来,通过薄膜分散法合成出新型PEG-LP-QDs,以期PEG-LP-QDs在体内示踪、肿瘤成像、多重检测等生物医学领域的应用奠定基础。

1 仪器与试剂

1.1 实验材料

二硬脂酰-磷脂酰胆碱(DSPC)、二硬脂酰-磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇-羧基(DSPE-PEG-COOH),购自aladdin公司;胆固醇,购自广州学友生物科技有限公司;油溶性量子点-525(ZnCdSe/ZnS-QDs-525),购自武汉珈源量子点技术开发有限公司,氯仿(分析纯),磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)。

1.2 实验仪器

Hitachi透射电子显微镜(日立高新技术公司);NS300纳米颗粒追踪分析仪(激发波长405 nm)(上海思百吉仪器系统有限公司);LS55荧光分光光度计(美国PerKins Elmer公司);ADVENTURER电子天

平AR64CN(0.000 1 mg);EYELA N-1100旋转蒸发仪,EYELA SB-1200恒温水箱锅(美国五洲东方科技发展有限公司);SHZ-D循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司);低温冷却循环泵(上海霄汉实业发展有限公司);SCIENTZ SB-5200超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司);VM-02U涡旋搅拌仪(Slien Shake公司);Gextruder-10ml脂质体挤出器(美国Genizer公司);WHATMAN Nuclepore膜聚碳酸酯(孔径为800、200 nm)。

2 实验方法

2.1 QDs处理条件的优化

使用氯仿对3 mg/mL的QDs进行稀释(200、300、600、1 200、3 000倍),获得不同浓度的QDs;在不同温度下(40、50、55℃)对QDs进行不同时间(0.5、1.0、1.5、2.0 h)温育,获得不同温度的QDs。

2.2 LPs、PEG-LP-QDs的合成

参考文献[17]的合成方法,步骤如下:取24 μL 0.1 mol/L DSPC、24 μL 1.0 mmol/L DSPE-PEG-COOH、15 μL 50 mmol/L胆固醇、不同体积(0、2.5、5、10、15、20、30 μL)的3 mg/mL QDs,溶解在3 mL的氯仿中,震荡5 min,使混合物充分混匀;将混合物倒入50 mL的圆底烧瓶中,用恒温水浴锅控制不同水浴温度(30、35、40、45、50、55、60℃),将旋转蒸发仪的转数调至60 r/min,开始恒温减压、旋转蒸发,成膜后继续旋转蒸发10 min,保证氯仿全部挥发;加入3 mL PBS,将得到的脂质浊液在超声波清洗机中超声30 min后得到多室脂质体。将上述脂质体依次通过装有800、200 nm的聚碳酸酯纤维膜的脂质体挤出器挤压10次,得到单室脂质体,4℃保存备用。

2.3 透射电子显微镜(Transmission Electron Microscope, TEM)观察LPs、PEG-LP-QDs的形貌

取适量LPs、PEG-LP-QDs滴于铜网上,用1%的磷钨酸负染色,自然干燥,在TEM下观察LPs、PEG-LP-QDs的形貌。

2.4 纳米颗粒追踪技术(Nanoparticle Tracking technology, NTA)检测LPs、PEG-LP-QDs

取适量LPs、PEG-LP-QDs,进行NTA测量,参数设置如下:camera level 14, 4 videos of 160 s。每个样本测量3次,计算平均粒径。

2.5 荧光分光光度计测量QDs、LPs、PEG-LP-QDs的荧光光谱

取适量QDs、LPs、PEG-LP-QDs加入到荧光比色皿中,室温下检测其荧光强度并记录数据,每个样本测量3次,计算平均荧光强度。荧光检测条件:扫速

700 nm/min, 激发波长 450 nm, 激发和发射狭缝宽度 10 nm。

3 结果与讨论

3.1 浓度及温度对 QDs 荧光强度的影响

图 1a 为 ZnCdSe/ZnS 量子点 ZnCdSe/ZnS-QDs 的吸收发射光谱图, 从图中可以看出 QDs 的激光光谱宽连续分布; 发射光谱窄对称分布, 发射波长在 518 nm 左右。图 1b 表明随着稀释倍数的增加, QDs 荧光强度随之降低, 但其发射波长 (518 nm) 没有发生改变, 依据 QDs 的尺寸效应可以推测浓度改变不会改变 QDs 的粒径^[20]; 图 1c 表明 QDs 在一定的水浴温度下温育一段时间后, 其荧光强度会降低, 随着水浴温度的升高, 荧光强度下降的幅度会增大。这与季文学等^[21]的研究发现相一致, 说明高温会淬灭 QDs 的荧光, 为后续制备 PEG-LP-QDs 选取最适温度提供一定参考。

3.2 不同合成温度下 LPs 的粒径比较

图 2 为不同合成温度下 LPs 的 NTA 粒径比较图。结果表明, 合成 LPs 时, 水浴温度会影响 LPs 的粒径分布, 随着温度升高到磷脂的相变温度, LPs 的粒径在不断增加, 当温度过高时, 会破坏脂质体膜的稳定性, LPs 的粒径发生减少。这也提示我们合成特定粒径的 LPs 需要选择特定的水浴温度。45 °C 时, 合成的 LPs 的粒径较大, 集中分布在 139 nm 左右; 40 °C 时, 集中分布在 107 nm 左右。

3.3 合成 LPs 的表征

图 3 为 40 °C 条件下合成 LPs 的 TEM 结果。由 TEM 结果可知 LPs 为封闭的中空球形囊泡; 由 NTA 结果 (图 2b) 可知 LPs 粒径集中分布在 107 nm 左右。

3.4 合成 PEG-LP-QDs 的表征

图 4a、b 分别为 PEG-LP-QDs (水浴温度为 40 °C) 的 TEM 及 NTA 图, PEG-LP-QDs 粒径大小为 128 nm, 相比 LPs (图 2b) 粒径增加。本实验 QDs 为油性 ZnCdSe/ZnS QDs, 因此可推断 QDs 被包裹到疏水的双层磷脂外壳中。Zhou 等^[17]提出相同的 LPs 包裹 QDs 的模式, 如图 4c 所示, 本研究合成的 PEG-LP-QDs 荧光探针具有同样的包裹模式。

3.5 包裹不同数量 QDs 的 PEG-LP-QDs 荧光强度比较

图 5 中曲线 B~E 显示包裹不同 QDs 数量的 PEG-LP-QDs 荧光光谱图, 随着包裹 QDs 数量的增加, PEG-LP-QDs 的荧光强度呈现先升高后降低的趋势; 比较图 5K、D, 我们发现相同量 (X 300) 的 QDs 被 LPs 包裹前 (图 5K)、包裹后 (图 5D) 荧光强度发生降低;

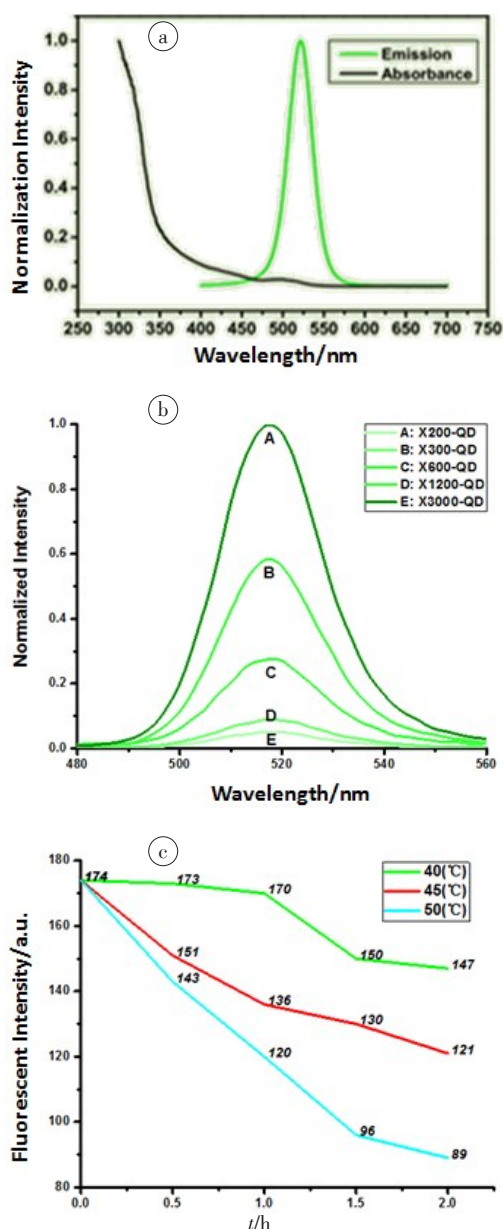


图1 不同浓度及温度对 QDs 荧光强度的影响

Fig.1 Effect of concentration and temperature on the fluorescence intensity of quantum dots (QDs)

a: UV-vis absorption (black lines) and photoluminescence emission spectra (green lines) of ZnCdSe/ZnS-QDs; b: Fluorescence maps of various concentrations of ZnCdSe/ZnS-QDs, with an excitation wavelength of 450 nm; c: Fluorescence changing of ZnCdSe/ZnS-QDs in various temperatures

PEG-LP-QDs 破膜后释放的 QDs (图 5H) 难以恢复到包裹前 (图 5K) 的荧光强度。

针对以上现象, 我们提出以下推测: (1) LPs 包裹 QDs 具有一定的包封率, 在达到最大包封率之前, LPs 包裹 QDs 量随着 QDs 的增加而增加, 当达到最大包封率后, LPs 包裹 QDs 不仅不会增加, 反而会减少。Batalla 等^[15]通过热透镜显微镜测量 PEG-LP-QDs 的包封率发现, 当加入 QDs 的数量在一定范围时, 其包封率在不断增加, 最高可达 36%, 一旦超过这一范围, 其包封率将大大降

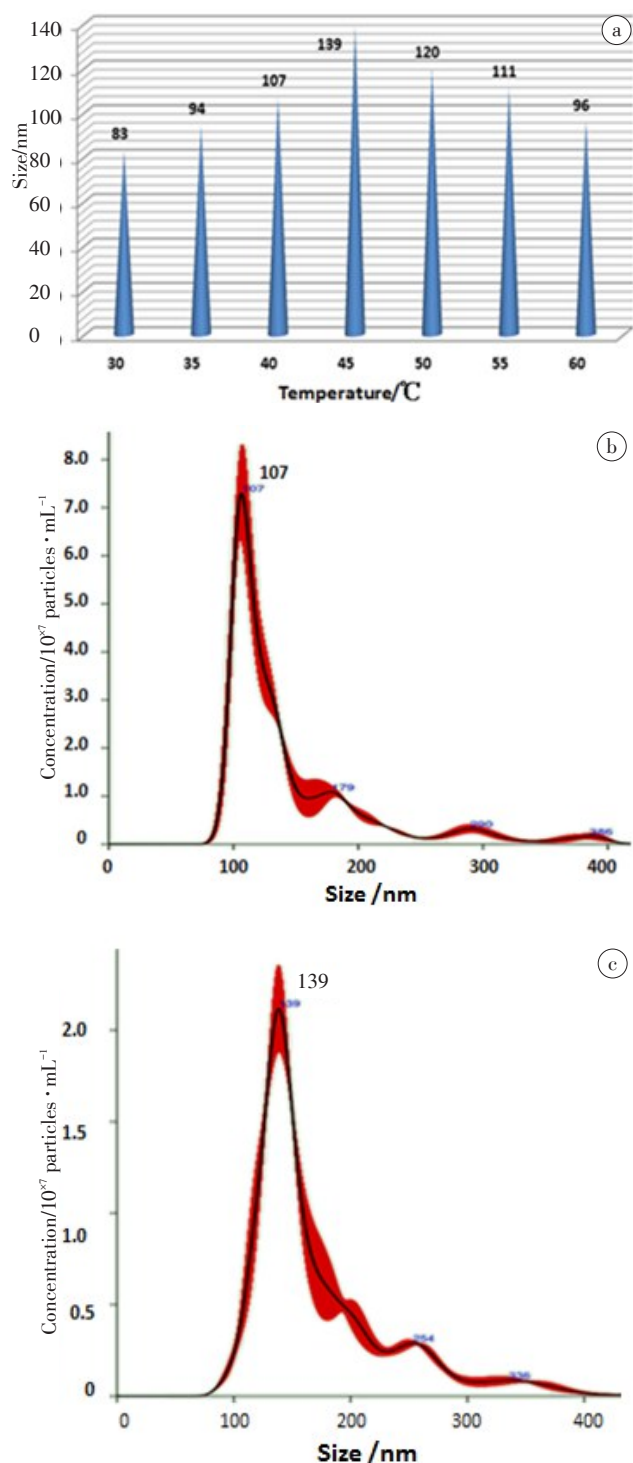


图2 不同合成温度下LPs的粒径比较

Fig.2 Size of liposomes (LPs) at different synthesis temperatures

a: Comparison of the average size measured by nanoparticle tracking technology (NTA) among liposomes which were synthesized under various temperatures; b-c: NTA size distribution of LP which were synthesized under 40 °C, 45 °C

低;此外,季文学等^[21]也发现随着LPs包裹的QDs数量的增加,其荧光强度呈现先升高后降低趋势。(2)磷脂分子对QDs具有荧光淬灭作用,冯力蕴等^[22]发现QDs被包裹前后荧光强度有所降低,并推测磷脂的疏水区

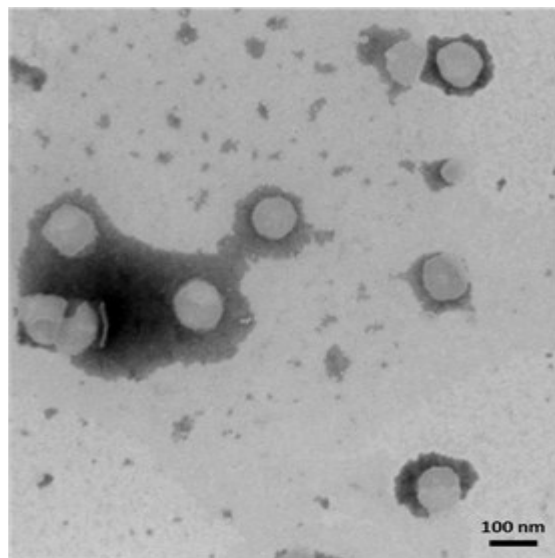


图3 水浴温度40°C合成的脂质体的TEM结果图

Fig.3 Transmission electron microscopy (TEM) results of LPS which were synthesized under 40°C

包裹QDs自组装成亲水区向外的磷脂囊泡,实现了QDs自油相到水相的相转移,这一过程中LPs淬灭部分QDs的荧光。即使破膜后QDs的荧光也无法恢复。(3)温度对QDs具有荧光淬灭作用。这势必影响PEG-LP-QDs作为荧光探针的应用,需要进一步研究如何提高LPs的包封率并减少磷脂和温度对QDs的淬灭作用来改善这一缺陷。

4 结论

本研究将生物亲和性较高的PEG-LPs和新型荧光量子点QDs的优势结合起来,成功合成新型PEG-LP-QDs,并用TEM、NTA和荧光分光光度计等多台仪器上鉴定并分析PEG-LP-QDs的形貌、粒径和荧光强度。在此基础上,为制备出粒径均一且荧光强度较高的PEG-LP-QDs,本研究探索水浴温度及QDs数量对PEG-LP-QDs合成效率及荧光强度的影响,结果证实合成温度在40 °C时对QDs的荧光淬灭作用最低,当加入10 μ L浓度为3 mg/mL的QDs时,PEG-LP-QDs的荧光强度达到最大值,粒径集中分布于128 nm左右。脂质体由磷脂分子在水相环境中自行组装而成,由中空亲水核心和脂质双层外壳两部分组成,利用这一仿生膜性结构可以实现对亲水或疏水性的药物或纳米探针颗粒的包裹,进一步将其应用于生物学领域中。量子点是荧光界的新宠儿,具有独特的发光特性:激光光谱宽、连续分布;发射光谱窄、对称分布;量子产率高;发光稳定,有望弥补传统有机荧光染料和荧光蛋白质生物标记、荧光淬灭等方面的不足。本研究成功合成的PEG-LP-QDs兼具仿生

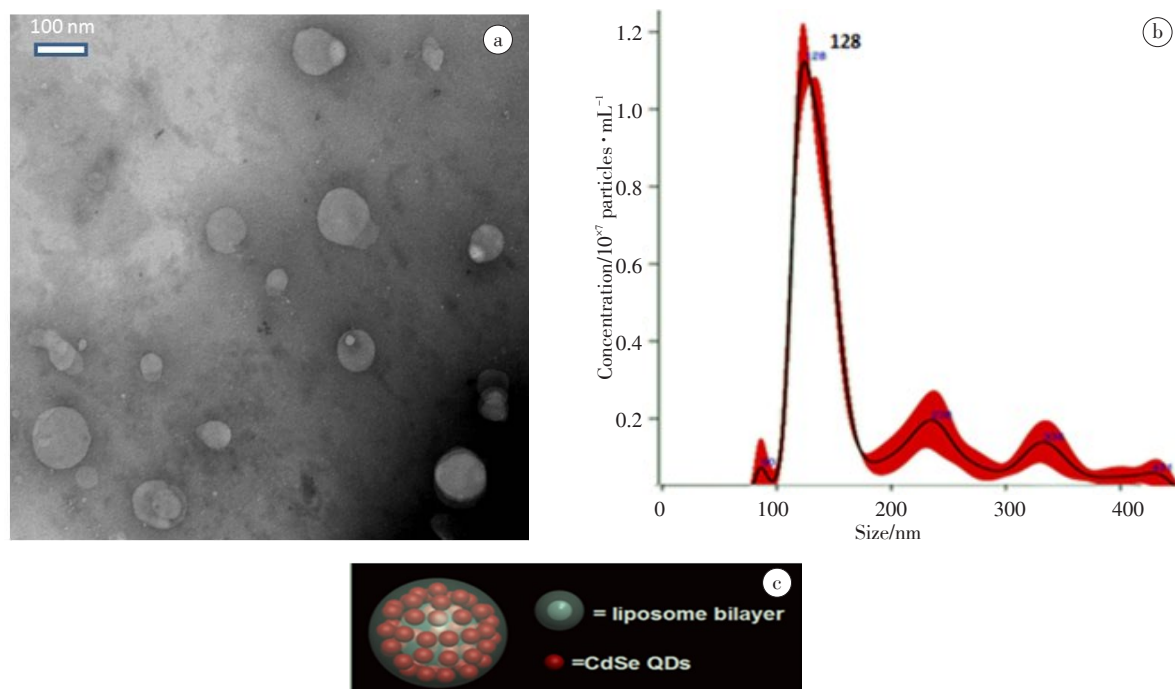


图4 水浴温度 40 °C合成的 PEG-LP-QDs 的 TEM结果图(a)和 NTA(b)结果图和 LPS 包裹 QDs 的 3D 模式图(c)

Fig4 TEM results (a) and NTA results (b) of PEG-LP-QDs synthesized under 40°C, and three-dimensional simulation model (c) of QDs which were encapsulated by LP

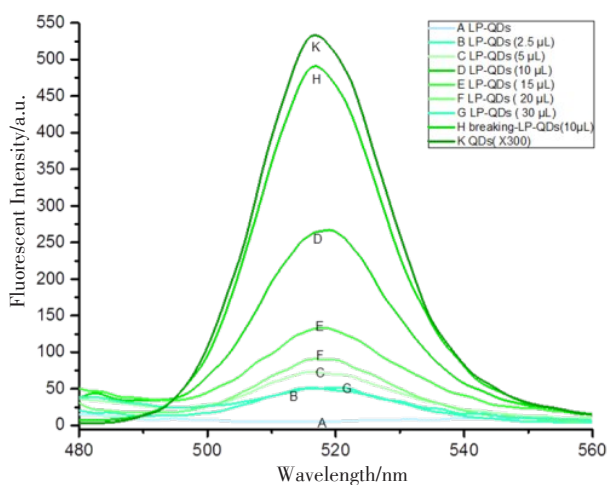


图5 PEG-LP-QDs 荧光光谱图(激发波长 450 nm)

Fig.5 Fluorescence maps of PEG-LP-QDs, with an excitation wavelength of 450nm

A: Fluorescence map of LP; B-G: Fluorescence maps of LP-QDs nanoprobes with 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 30.0 μL 3 mg/mL QDs; H: Fluorescence map of breaking LP-QD nanoprobes with 10 μL 3 mg/mL QDs; K: Fluorescence map of 10 μL 3 mg/mL QDs after being diluted 300 times

膜性结构及独特的荧光特征优势,原料便宜易得、制备流程简单、可大规模生产,具有广阔的潜在应用价值;且对 PEG-LP-QDs 的鉴定与分析为后续探索其在体内示踪、肿瘤成像、多重检测等生物医学领域的应用打下了良好的前期基础。

【参考文献】

- [1] JANG E S, LEE S Y, CHA E J, et al. Fluorescent dye labeled iron oxide/silica core/shell nanoparticle as a multimodal imaging probe [J]. Pharm Res, 2014, 31(12): 3371-3378.
- [2] WU X, SUN S, WANG Y, et al. A fluorescent carbon-dots-based mitochondria-targetable nanoprobe for peroxynitrite sensing in living cells[J]. Biosens Bioelectron, 2017, 90: 501-507.
- [3] WAN Y, WANG P, SU Y, et al. Nanoprobe-initiated enzymatic polymerization for highly sensitive electrochemical DNA detection[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2015, 7(46): 25618-25623.
- [4] ANSEN S N, POSPISILOVA A, EICHLER T W, et al. A novel nanoprobe for multimodal imaging is effectively incorporated into human melanoma metastatic cell lines[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(9): 21658-21680.
- [5] YUE Q, GAO X, YU Y, et al. An EGFRvIII targeted dual-modal gold nanoprobe for imaging-guided brain tumor surgery[J]. Nanoscale, 2017, 9(23): 7930-7940.
- [6] KE J H, LIN J J, CAREY J R, et al. A specific tumor-targeting magnetofluorescent nanoprobe for dual-modality molecular imaging [J]. Biomaterials, 2010, 31(7): 1707-1715.
- [7] 乔斌, 邓黎明, 王志刚. 细胞膜仿生纳米探针在肿瘤靶向治疗中的研究进展[J]. 重庆医科大学学报, 2018, 43(5): 1-4.
- [8] QIAO B, DENG L M, WANG Z G. Research progress of cell membrane biomimetic nanomaterial in tumor targeted therapy [J]. Journal of Chongqing Medical University, 2018, 43(5): 1-4.
- [9] BANGHAM A D, STANDISH M M, WATKIN J C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids[J]. J Mol Biol, 1965, 13(1): 238-252.
- [10] ELHISSI A. Liposomes for pulmonary drug delivery: the role of formulation and inhalation device design[J]. Curr Pharm Des, 2017, 23(3): 362-372.
- [11] LEE J S, HWANG S Y, LEE E K. Imaging-based analysis of liposome

- internalization to macrophage cells: effects of liposome size and surface modification with PEG moiety [J]. *Colloids Surf B Biointerface*, 2015, 136: 786-790.
- [11] 谷巧荣, 艾俊杰, 张倩云, 等. 脂质体荧光探针检测磷脂酶C的活性[J]. *分析化学*, 2017, 45(9): 1278-1283.
- GU Q R, AI J J, ZHANG Q Y, et al. Fluorescence assay for phospholipase C activity using liposome probes[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2017, 45(9): 1278-1283.
- [12] GUAN T, SHANG W, LI H, et al. From detection to resection: photoacoustic tomography and surgery guidance with indocyanine green loaded gold nanorod @ liposome core-shell nanoparticles in liver cancer[J]. *Bioconjug Chem*, 2017, 28(4): 1221-1228.
- [13] MICHALET X, PINAUD F F, BENTOLILA L A, et al. Quantum dots for live cells, *in vivo* imaging, and diagnostics[J]. *Science*, 2005, 307(5709): 538-544.
- [14] ABDEL-MOTTALEB M M, BEDUNEAU A, PELLEQUER Y, et al. Stability of fluorescent labels in PLGA polymeric nanoparticles: quantum dots *versus* organic dyes[J]. *Int J Pharm*, 2015, 494(1): 471-478.
- [15] BATALLA J, CABRERA H, SAN M E, et al. Encapsulation efficiency of CdSe/ZnS quantum dots by liposomes determined by thermal lens microscopy[J]. *Biomed Opt Express*, 2015, 6(10): 3898-3906.
- [16] WANG M, WANG J, SUN H, et al. Time-dependent toxicity of cadmium telluride quantum dots on liver and kidneys in mice: histopathological changes with elevated free cadmium ions and hydroxyl radicals[J]. *Int J Nanomedicine*, 2016, 11: 2319-2328.
- [17] ZHOU J, WANG Q X, ZHANG C Y. Liposome-quantum dot complexes enable multiplexed detection of attomolar DNAs without target amplification [J]. *J Am Chem Soc*, 2013, 135(6): 2056-2059.
- [18] MATOS A L, PEREIRA G, CABRAL F P, et al. Delivery of cationic quantum dots using fusogenic liposomes in living cells [J]. *J Photochem Photobiol B*, 2017, 171: 43-49.
- [19] XU H L, YAM J J, ZHUGE D L, et al. Glioma-targeted delivery of a theranostic liposome integrated with quantum dots, superparamagnetic iron oxide, and cilengitide for dual-imaging guiding cancer surgery[J]. *Adv Healthc Mater*, 2018, 7(9): e1701130.
- [20] 胡珺, 杨畅, 陈思颖, 等. 叶酸偶联荧光量子点脂质体纳米探针的合成[J]. *贵州医科大学学报*, 2017, 42(1): 45-51.
- HU J, YANG C, CHEN S Y, et al. Synthesis of folate-conjugated quantum dots liposome nanoprobe[J]. *Journal of Guizhou Medical University*, 2017, 42(1): 45-51.
- [21] 季文学, 张纪梅, 宋秀云, 等. 脂质体包裹的CdTe复合量子点的合成[J]. *天津工业大学学报*, 2007, 26(3): 49-51.
- LI W X, ZHANG J M, SONG X Y, et al. Synthesis of CdTe composite quantum dots encapsulated by liposome [J]. *Journal of Tianjin Polytechnic University*, 2007, 26(3): 49-51.
- [22] 冯力蕴, 孔祥贵. 复合荧光CdSe量子点-脂质体的制备与表征[J]. *发光学报*, 2007, 28(9): 417-420.
- FENG L Y, KONG X G. Preparation and characterization of fluorescence CdSe- liposome compound [J]. *Chinese Journal of Luminescence*, 2007, 28(9): 417-420.

(编辑:薛泽玲)